

**MASTER 2EME ANNEE**  
**MENTION SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT-BGAE**  
**SPECIALITE BIODIVERSITE DES INTERACTIONS MICROBIENNES ET**  
**PARASITAIRES**

**PARCOURS SANTE ANIMALE ET EPIDEMIOSURVEILLANCE**  
**DANS LES PAYS DU SUD (SAEPS)**

---

**RAPPORT DE STAGE**

**« IDENTIFICATION DES TRYPANOSOMES**  
**CIRCULANT CHEZ LES RONGEURS ET LES**  
**BOVINS EN ASIE DU SUD-EST »**

Présenté par  
**Cristina MILOCCO**

Réalisé sous la direction de : Serge MORAND et Marc DESQUESNES  
Organisme et pays : CNRS, CIRAD, Université de Kasetsart, Thaïlande  
Période du stage : 22 Mars-2 Septembre 2009  
Date de soutenance : 17-18 Septembre 2009



Année universitaire 2008-2009

**MASTER 2EME ANNEE**  
**MENTION SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT-BGAE**  
**SPECIALITE BIODIVERSITE DES INTERACTIONS MICROBIENNES ET**  
**PARASITAIRES**

**PARCOURS SANTE ANIMALE ET EPIDEMIOSURVEILLANCE**  
**DANS LES PAYS DU SUD (SAEPS)**

---

**RAPPORT DE STAGE**

**« IDENTIFICATION DES TRYPANOSOMES  
CIRCULANT CHEZ LES RONGEURS ET LES  
BOVINS EN ASIE DU SUD-EST »**

Présenté par  
**Cristina MILOCCO**

Réalisé sous la direction de : Serge MORAND et Marc DESQUESNES

Organisme et pays : CNRS, CIRAD, Université de Kasetsart, Thaïlande

Période du stage : 22 Mars-2 Septembre 2009

Date de soutenance : 17-18 Septembre 2009



Année universitaire 2008-2009

# « Identification des trypanosomes circulant chez les rongeurs et les bovins en Asie du Sud-est »

## Résumé et mots-clés

## Liste de figures et des tableaux

## Remerciements

## Introduction

### Présentation générale

1.1. Les trypanosomes .....	1
1.1.1. <i>Trypanosoma lewisi</i> .....	2
1.1.2. <i>Trypanosoma evansi</i> .....	5
1.1.3. <i>Trypanosoma theileri</i> .....	7
1.2. Le projet CERoPath.....	8
1.3. Thématique.....	9

### Matériels et méthodes

2.1. Mission de terrain rongeurs.....	10
2.1.1 Captures.....	10
2.1.2 Dissections et prélèvements.....	11
2.1.3. Mesures.....	14
2.2. Mission de terrain bétail .....	15
2.3. Analyses sérologiques	
2.3.1. CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis) – <i>T. evansi</i> .....	17
2.3.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	18
2.4. PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	20
2.4.1. Amorces utilisées.....	21
2.4.2. Préparation de la PCR.....	22

<b>Résultats.....</b>	<b>24</b>
-----------------------	-----------

<b>Discussion.....</b>	<b>31</b>
------------------------	-----------

<b>Conclusion.....</b>	<b>34</b>
------------------------	-----------

## Bibliographie

## Annexes

Annexe 1 : Extraction d'ADN à partir du sang congelé avec le kit « Genaid ®»

Annexe 2 : Préparation des échantillons au phénol chloroforme pour la réalisation de PCR

Annexe 3 : Préparation d'antigènes solubles de *T. lewisi* pour l'ELISA

## RÉSUMÉ

L'Asie du Sud-est est une région soumise à grands changements environnementaux récents, où les rongeurs sont des réservoir des plusieurs maladies pour l'homme et pour les animaux. La trypanosomose à *T. evansi* est une cause d'importantes pertes chez les bovins, récemment l'hypothèse que les rongeurs puissent être un réservoir pour ces animaux a été formulée. Le but étant d'identifier les trypanosomes circulant chez le rongeurs, d'évaluer leur possible rôle de réservoir pour les bovins. Pour cela nous avons utilisé différents méthodes de diagnostique. L'examen direct dans la mesure du possible a été effectué ; autant que des techniques sérologiques comme le test CATT et ELISA, et des PCR avec les amorces TRYP1 et TBR. Ces outils permettant un diagnostique ont été évalués et adaptés aux rongeurs. Nos résultats ont permis d'identifier *T. lewisi* chez les rongeurs, mais également que *T. evansi* est enzootique chez les rongeurs thaïlandaises.

**Mots clés :** *T.evansi*, *T. lewisi*, Asie Sud-est, trypanosomose, rongeurs, bovins, réservoir, diagnostique.

## ABSTRACT

The South-East Asia is a region subjected to considerable environmental changes, where rodents are reservoirs of many diseases for man and animals. The trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* is responsible of many economic losses among cattle, and recently the hypothesis that rodents could be an reservoir for these animals has been expressed. The purpose was to identify the trypanosomes circulating in rodents, to assess their possible role of reservoir for cattle. For doing this, we have used various diagnostic methods. The direct examination has been done, when possible ; serological techniques such as the CATT test and ELISA, and PCR with TRYP1 and TBR primers. These tools allowing the diagnostic, have been evaluated and fit to rodents. Our results enabled us to identify *Trypanosoma lewisi* in rodents, and to affirm that *Trypanosoma evansi* is enzootic in Thailand's rodents.

**Key words :** *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma lewisi*, South-East Asia, trypanosomiasis, cattle, rodents, reservoir, diagnostic.

## Remerciements

Je tiens à remercier mon maitre de stage, Serge Morand, et le docteur Marc Desquesnes pour m'avoir aidée, donnée des conseils et encouragée pendant mon stage en Thaïlande, avant et même après. Pour avoir partagée des super missions de terrain, pour avoir essayer de me faire comprendre qu'est-ce que c'est la recherche et le labo.

I really want to thank Ketsarin for her patience, her kindness, her frienship : her and all the staff of the lab were essential for my research.

Je veux aussi remercier toute l'équipe de Ceropath pour les missions de terrain et l'aide dans le traitement des données.

Merci Timothée, avec toi j'ai tout partagé de le debout, et j'espère de pouvoir continuer comme ça très longtemps ! Merci Max, Romain, Jc, José, Bill, Philippe, Antoine, Tist, May pour les soirées, les Chang, pour avoir découvert la Thaïlande ensemble d'une façon inoubliable. Merci P'yuk et Wit pour la muay thai et pour votre amitié.

E certo ringrazio i miei genitori e la mia famiglia, che ancora mi sono stati vicini in questa ennesima avventura, incoraggiandomi nonostante tutto ad andare avanti : non so come sarei né come farei senza di voi ! Grazie ai miei amici che mi han fatto sentire meno lontana da casa nonostante 10000 km e quasi 6 mesi di lontananza non siano facili neanche per delle persone geniali come noi : Marta, Scodo, Salomé, Elena, grazie per aver sopportato telefonate ad ore improbabili e racconti altrettanto assurdi !

## Liste de figures :

Fig. 1 : <i>Trypanosoma lewisi</i> formes sanguines (cliché Desquesnes M.).....	3
Fig. 2 : <i>Trypanosoma evansi</i> sur frottis de sang de rat (cliché Desquesnes M.).....	5
Fig. 3 : <i>Trypanosoma theileri</i> dans du sang bovin. (Cliché Villa A.) .....	7
Fig. 4 : Lieux de piégeage rongeurs, mission Paksé, Laos, avril 2009.....	10
Fig. 5 : Pièges utilisé lors des missions de capture.....	11
Fig. 6 : Prélèvement des organes lors des sacrifices.....	12
Fig. 7 : Prélèvement de sang de buffles pendant la mission de terrain à Buriram, Thaïlande, juin 2009.. .....	15
Fig. 8 : Carte de distribution des lignes de piégeage des rongeurs pour la mission CERoPath à Buriram, juin 2009.....	16
Fig. 9 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TBR sur les échantillons des rongeurs de Mondolkiri.....	29
Fig. 10 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TRYP1 sur les échantillons des rongeurs de Mondolkiri.....	29
Fig. 11 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TBR sur les échantillons des rongeurs de Kasetsart. Trois échantillons parmi les cinq testés donnent un produit positif pour <i>T. evansi</i> .....	30

## Liste des tableaux :

Tabl. 1 : Résultats du piégeage de la mission du 06/2008 à Nan.....	24
Tabl. 2 : Résultats du piégeage des missions du 11/2007 et du 02/2008 à Loei.....	25
Tabl. 3 : Résultats du piégeage de la mission du 11/2008 et 06/2009 à Buriram.....	25
Tabl. 4 : Résultats de l'échantillonnage sur le bovins à Buriram, mission du 06/2009.....	25
Tabl. 5 : Résultats du piégeage de la mission du 07/2008 à Luang Prabang.....	26
Tabl. 6 : Résultats du piégeage de la mission du 04/2009 à Paksé.....	26
Tabl. 7 : Résultats du piégeage des missions du 02/2008 et 11/2008 à Veal Renh.....	26
Tabl. 8 : Résultats du piégeage du 03/2009 à Mondolkiri (deuxième lot PCR).....	27
Tabl. 9 : Résultats du piégeage à l'université de Kasetsart (troisième lot PCR).....	27

# INTRODUCTION

## 1.1. Les trypanosomes

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés de la famille des *Trypanosomatidae* qui appartiennent au genre *Trypanosoma*. Ce sont des parasites des plantes (*Phytomonas*), et du sang, de la lymphe, des tissus ou des cavités de toutes les classes de vertébrés ; le cycle des trypanosomes des vertébrés inclut deux hôtes, un vertébré et un invertébré hématophage. Les formes sanguines (trypomastigotes) sont prélevées par l'invertébré hématophage (lors d'un repas de sang), chez qui elles effectuent un cycle aboutissant au développement de formes infectantes (*T. evansi* et *T. equiperdum* faisant exception), les métatrypanosomes. Celles-ci seront transmises à l'hôte vertébré lors d'un nouveau repas sanguin.

Ces formes infectantes ont un corps allongé, de section ovale, avec l'extrémité antérieure pointue ; l'extrémité postérieure est quand à elle plus arrondie, même si chez quelques espèces (par exemple *T. lewisi*) elle est plus effilée et semble parfois rigide (*T. theileri*). Le flagelle prend son origine à l'extrémité postérieure et, en courant au long de la membrane ondulante, suit le corps pour devenir libre à l'extrémité antérieure (Hoare, 1972). Le noyau peut avoir différentes localisations selon l'espèce et le stade de développement, mais dans les formes sanguines il est habituellement au centre du parasite, ou vers la partie antérieure. Le kinétoplaste est toujours situé à la base du flagelle, dans la partie postérieure du parasite : la taille et la forme changent chez les différentes espèces. Il fait partie du système mitochondrial : il en est une dilatation qui contient de l'ADN. La multiplication est asexuelle, et la division commence toujours de la partie postérieure du corps.

Nous connaissons 125 espèces de trypanosomes dont les plus étudiées sont les espèces responsables de maladies chez l'homme (maladie du sommeil en Afrique ou maladie de Chagas en Amérique du sud) ou chez l'animal (Nagana en Afrique, Surra en Asie, Mal de caderas ou Murrina en Amérique, Dourine partout dans le monde). Ces espèces peuvent être divisées en deux groupes, selon leur façon de se développer dans l'insecte vecteur et dans l'hôte : les Stercoraria et les Salivaria (Hoare, 1964).

Le développement des trypanosomes appartenant au groupe des Stercoraria se situe dans la partie distale du tube digestif de l'insecte : la transmission a lieu quand les excréments infectés de



l'insecte sont déposées sur les muqueuses ou sur des abrasions de la peau de l'hôte, ce qui permet la pénétration du trypanosome, ou encore par ingestion de l'arthropode (*T. melophagium*). Les trypanosomes *lewisi* et *lewisi-like* font partie de ce groupe.

Les trypanosomes du groupe *Salivaria* se développent dans la partie antérieure du tube digestif du vecteur et la contamination se produit par inoculation. Ce groupe comprend l'espèce *Trypanosoma evansi*, même si cette dernière est une exception puisqu'elle n'effectue aucun cycle chez le vecteur qui n'est responsable que de sa transmission mécanique.

Chaque espèce peut infecter une ou plusieurs espèces d'hôte : la plus grande partie des espèces du sous-genre *Herpetosoma* infecte les rongeurs, en particulier *T. lewisi* et les espèces *lewisi-like*. Il y a en revanche des espèces présentant un plus large spectre d'hôte : *T. theileri* chez les bovidés, et *T. evansi* chez de très nombreux mammifères.

### ***1.1.1. Trypanosoma lewisi***

*Trypanosoma lewisi* est l'espèce type du sous-genre *Herpetosoma*, appartenant au groupe *Stercoraria*. C'est un parasite commun de *Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*. Nous connaissons au moins 45 espèces dans le même sous-genre. Comme elles sont toutes indiscernables de *T. lewisi* d'un point de vue morphologique, elles sont regroupées sous le nom de « *lewisi-like* ».

*Trypanosoma lewisi* est un parasite cosmopolite présent chez les *Rattus spp*, et son vecteur cyclique est une puce : *Nosopsyllus fasciatus* dans les zones tempérées et *Xenopsylla cheopis* dans les zones tropicales. D'autres puces, comme *Leptosylla segnis* et *Pulex irritans*, respectivement puces de la souris et de l'homme, peuvent servir de réservoir (d'après Noller, 1912, et Wenyon, 1913, cités par Hoare, 1972).

Ce trypanosome se présente classiquement sous deux formes biologiques : épimastigote dans l'intestin de l'insecte, et trypomastigote dans le sang du rat (Maraghi, 1995) ; toutefois il possède également plusieurs aspects morphologiques au cours de sa multiplication chez le rat, jusqu'à sa forme de trypomastigote (Hoare, 1972). À l'observation directe sur un prélèvement frais, il est très actif : il change souvent de direction et il traverse le champ du microscope. Largement décrite par Taliaferro (1926), Hoare (1938) et Davis (1952), la forme de trypomastigote est courbée, de taille moyenne (21-36 µm) avec un flagelle libre de 7,2-7,8 µm. Le noyau est ovale et positionné dans la

moitié antérieure du corps. La membrane ondulante forme plusieurs vagues mais est peu développée, et ne retient pas le colorant.



**Figure 1 : *Trypanosoma lewisi*, formes sanguines (cliché Desquesnes M.)**

L'infection chez le rat conduit à un certain équilibre hôte-parasite, avec une réponse immunitaire efficace qui empêche sa multiplication ; selon Balber (1986), *T. lewisi* ne présente pas de variations antigéniques et pour cette raison, l'élimination du parasite est complète et les rats sont protégés contre une éventuelle réinfection. D'autre part *T. lewisi* possède des protéines de surface sur lesquelles se fixent des anticorps non spécifiques des rats -

Dans son étude Lincicome (1963) compare le gain de poids d'un groupe de rats infectés avec *T. lewisi* avec celui du groupe de non infectés ; les animaux parasités ont montré une augmentation du poids supérieure à celle des contrôles négatifs jusqu'au 31%. Lincicome suppose l'existence d'une forme de commensalisme entre le trypanosome et son hôte.

Cette hypothèse est mise en discussion par Wyatt (2008) qui affirme que l'extinction de l'espèce endémique sur Christmas Island, *Rattus macleari*, a été causée par l'introduction de *Trypanosoma lewisi* avec l'arrivée de *Rattus rattus*. L'extinction ayant eu lieu au début du vingtième siècle, les analyses ont été effectuées sur des échantillons d'individus conservés au Musée d'Histoire Naturelle de Londres, au Musée de Zoologie de Cambridge et à l'Université d'Oxford. Des PCR ont été réalisées avec les amorces TRYPA et TRYPB, sur des individus prélevés avant et après l'introduction sur l'île de *Rattus rattus*, pour mettre en évidence la présence d'ADN de *Trypanosoma lewisi*. L'ADN n'a été détecté que chez les individus capturés après l'arrivée de la

nouvelle espèce de rongeurs, porteuse du parasite et de la puce responsable de sa transmission. Cette observation est en faveur de la responsabilité de *T. lewisi* dans l'extinction du rat endémique qui aurait succombé très rapidement, en moins de 9 ans. Toutefois, si ces éléments démontrent l'entrée de *T. lewisi* sur l'île, il est difficile de montrer sa responsabilité dans la disparition de l'espèce de rat endémique. De plus, beaucoup d'autres facteurs ont pu jouer un rôle déterminant dans cet événement.

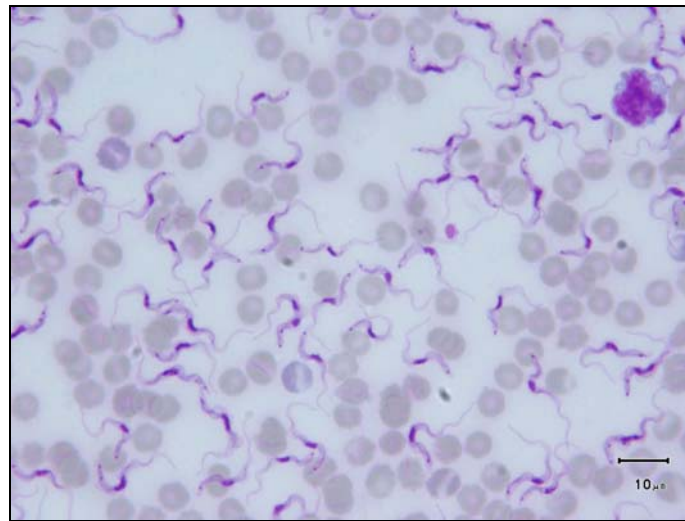
En laboratoire, des souches avec différents niveaux de virulence ont été isolées (Jurgens 1902, Brown 1914) : même si *T. lewisi* est spécifique d'espèce dans la nature, quelques souches se sont révélées capables de causer une mortalité chez la souris. En plus de l'anémie, de la fièvre et une perte du poids, les rats infectés avec ces souches montrent d'importants signes d'insuffisance respiratoire et d'entérite. Tous les animaux sont morts entre 6 et 9 jours après inoculation. Donc, même s'il est considéré comme non-pathogène chez le rat, ce parasite peut montrer des niveaux de virulence fatals à son hôte en conditions expérimentales.

Des cas humains ont été rapportés. En effet, dès 1933, *T. lewisi* a été retrouvé dans le sang d'un enfant malaisien de quatre ans. Ces parasites n'ont pourtant pas été capables de réinfecter des rats (Johnson, 1933) leur identité n'est donc pas confirmée. In Inde, en 1974, deux cas humains ont été décrits (Shrivastava, 1974), et dans la Chine du nord-est une séroconversion a été démontrée chez des éleveurs (Liu & Liu, 1990 cité par Lun, 2008). Aucun de ces patients n'a eu besoin de traitement, leur guérison s'étant établie naturellement en quelques jours. Le premier cas africain a été décrit en Gambie chez un enfant qui présentait d'importants signes cliniques avec une invasion parasitaire du système nerveux central (Howie 2006). En Thaïlande une infection à *T. lewisi-like* a été diagnostiquée chez un enfant de 45 jours (Sarataphan, 2007). Tous ces cas démontrent que certaines souches de *T. lewisi* et de *T. lewisi-like* sont parfois capables d'échapper à la réponse immunitaire d'un sérum humain normal (Lun, 2008) et d'y établir une infection avec ou sans signes cliniques : il est donc souhaitable que soient mis en place des études approfondies sur les hôtes et les vecteurs de ces souches.

### ***1.1.3 Trypanosoma evansi***

*Trypanosoma evansi* est le premier trypanosome pathogène qui a été découvert, à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, en Inde, par Griffith Evans (1880). Sa distribution s'étend sur toutes les zones tempérées et

chaudes de la planète. Selon Hoare (1972), il serait issu de *T. brucei* qui aurait infecté des dromadaires au sud du Sahara grâce au contact avec des vecteurs cycliques (glossines), et se serait ensuite propagé grâce à des vecteurs mécaniques au cours de leurs déplacements en Afrique et en Asie. Le commerce du bétail infecté aurait ensuite permis la propagation de *T. evansi* partout dans le monde. Il se différencie de *T. brucei* pour la perte de maxicercles d'ADN kinétoplastique, cette délétion empêche le développement cyclique du parasite dans le vecteur (Borst, 1987).



**Figure 2 : *Trypanosoma evansi* sur frottis de sang de rat (cliché Desquesnes M.)**

Ce trypanosome est de taille moyenne, 15-34 µm, avec la partie libre du flagelle qui mesure entre 3 et 5 µm. La membrane ondulante est très bien développée et ses déplacements sont limités, même si le parasite présente une attitude très active à l'observation directe.

Comme *T. brucei* il appartient au sous-genre Trypanozoon, du groupe Salivaria, et il est transmis uniquement de façon mécanique principalement par les pièces buccales des Tabanidae et des Stomoxyinae. Il n'a donc pas de vecteur cyclique, mais l'insecte propage l'infection en se nourrissant sur un mammifère sain après un repas de sang sur un mammifère infecté.

Une autre voie de transmission de l'infection est la voie orale : les animaux peuvent s'infecter en mangeant des proies fraîches infectées, comme dans le cas des carnivores et des rongeurs. Dans ces

cas, le trypanosome pénètre chez l'hôte à la faveur d'une lésion de la cavité buccale ou en traversant les muqueuses.

En Amérique du Sud, un autre vecteur est capable de transmettre *T. evansi* : la chauve-souris *Desmodus rotundus*, qui par la grande quantité de sang ingérée et la persistance de l'infection dans le temps, est un important agent de diffusion du parasite (d'après les études de Dunn 1932, Johnson 1936, cités par Hoare, 1972). Elle joue les rôles de réservoir aussi bien que d'hôte et de vecteur mécanique : elle peut s'infecter soit par voie perorale pendant un repas sanguin, soit par voie transcutanée, en cas de morsure par une autre chauve-souris infectée.

Le spectre d'hôte de *T. evansi* est très large, comprenant des animaux domestiques ou sauvages. Les principaux hôtes sont les dromadaires, les équidés, les chiens et les bovins.

Le cours de l'infection dépend de plusieurs facteurs : la virulence de la souche, la sensibilité de l'hôte et les conditions épidémiologiques locales. Chez les espèces les plus sensibles, les symptômes principaux sont l'hyperthermie, l'anémie, la formation d'œdèmes et la cachexie. Comme pour toutes les trypanosomoses, il ne s'agit pas de signes spécifiques. Après la période d'incubation, d'une durée variable, le parasite envahit le sang avec une parasitémie croissante qui provoque de la fièvre ; cependant la parasitémie est fluctuante, donc pas toujours détectable à l'examen direct. Ceci est dû à la localisation profonde du parasite, qui peut rester à l'abri des défenses immunitaires de l'hôte pour ré-envahir la circulation sanguine.

Chez les chevaux, les dromadaires et les chiens l'infection est souvent aiguë : la mortalité chez les équins peut dépasser 50% (Silva et al 1995). En revanche, chez les bovins et les porcs, l'infection peut se présenter sous une forme chronique voire inapparente : son impact dépend de la virulence de la souche présente.

Chez les buffles, ont été décrits des infections inapparentes mais aussi des cas avec des signes cliniques importants : Löhr et Pohlpark (1985) rapportent de la cachexie, de l'inappétence, de l'anémie, des œdèmes des membres, myocardite, dyspnée, hypertrophie des nodules lymphatiques autant que du foie et de la rate. Une diminution des performances reproductrices peut aussi se produire.

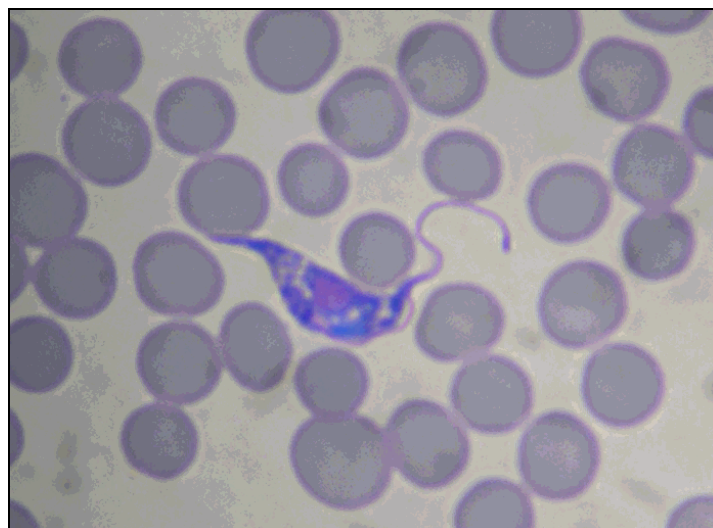
Chez les porcs, *T. evansi* peut causer des avortements, même si les manifestations cliniques sont le plus souvent inapparentes.

Le Surra, nom avec lequel la trypanosomose à *T. evansi* est connue depuis longtemps, est responsable le plus souvent d'infections inapparentes chez les bovidés. La chute de production et les avortements chez les bovins laitiers, et un affaiblissement général qui diminue la force du travail du bétail sont les signes les plus constants. De plus, l'infection cause une immunodépression qui intéresse aussi bien les réponses immunitaires cellulaire et humorale (Onah, 2000): cette action sur le système immunitaire peut interférer avec les vaccinations, et peut favoriser les maladies intercurrentes. Chez les petits ruminants, nous reconnaissons une forme intermédiaire (Hornby, 1953) et la pathogénicité est hautement variable selon les sources.

#### **1.1.4. *Trypanosoma theileri***

C'est l'espèce-type du sous-genre *Megatrypanum*, du groupe des Stercoraria ; c'est un parasite commun des bovidés domestiques (bovins, buffles) présent partout dans le monde et des antilopes en Afrique. La transmission peut se réaliser mécaniquement, cycliquement ou par voie transplacentaire.

*T. theileri* est l'un des plus grands trypanosomes, sa forme adulte mesurant entre 69 et 109  $\mu\text{m}$  et son flagelle de 4 à 26  $\mu\text{m}$ . Ses mouvements sont plus lents et plus ondulatoires que les autres espèces.



**Figure 3 : *Trypanosoma theileri* dans du sang bovin. (Cliché Villa A.)**

Ses hôtes cycliques sont des Tabanidés, dans lesquels a lieu le développement des formes infectantes, les métatrypanosomes. L'hôte définitif va s'infecter par contamination de la plaie due à la piqûre du taon, avec les excréments de l'insecte. Il peut aussi s'infecter par voie perorale en cas d'ingestion du vecteur (Kraneveld, 1931 cité par Hoare, 1972).

L'infection ne produit aucun signe clinique chez l'hôte, qui reste en fait un porteur asymptomatique du parasite, avec une parasitémie jamais très importante (Hoare, 1972). Ce trypanosome est généralement considéré comme non-pathogène.

Il a été observé cependant que, dans le cas d'infections intercurrentes, la parasitémie monte d'une façon inhabituelle : une symptomatologie spécifique n'a pas été démontrée, mais selon Hoare la multiplication de *T. theileri* est due à une réponse immunitaire directe contre le pathogène intercurrent. Cette éventuelle forte parasitémie peut interférer avec le diagnostic parasitologique d'une pathologie due à un autre parasite en cachant la véritable cause sous-jacente.

## **1.2. Le Projet CERoPath**

Le projet CERoPath (Community Ecology of Rodents and their Pathogens in South-East Asia) est né de la collaboration de plusieurs organismes de recherche de cinq pays différents (France, Thaïlande, Laos, Cambodge, Finlande) et il a une durée prévue de quatre ans, de 2008 à fin 2011. Il vise à analyser les dynamiques des communautés de rongeurs murins, de leurs parasites (helminthes, arthropodes) et pathogènes (microparasites et microchampignons pathogènes) en Asie du Sud-est : une région caractérisée par une forte biodiversité et par des modifications importantes des habitats en raison d'un fort développement et d'une insertion dans l'économie globale. Dans cette région, les rongeurs sont les réservoirs de nombreux agents de maladies chez les humains (fièvre hémorragique, typhus, peste, leptospirose) et les animaux (trypanosome).

Le projet a pour but de caractériser les processus contribuant aux phénomènes observés des associations hôte-pathogène, sous l'effet des changements de l'environnement, à l'aide des concepts et de méthodes de l'écologie et de l'évolution (niche environnementale, génétique des populations, immunogénétique, épidémiologie moléculaire et phylogénie). Afin de caractériser l'effet de

l'environnement sur les assemblages hôte-pathogène, les outils d'information géographique et de l'imagerie satellitaire sont également employés.

C'est dans le cadre de ce projet que s'insère mon stage : deux missions de terrain ont été effectuées, la première au Laos pour le piégeage des rongeurs et la deuxième dans le district de Buriram, en Thaïlande, pour procéder à des prélèvements à la fois sur le bétail et sur les rongeurs.

En ce qui concerne les analyses de laboratoire, elles ont été exécutées à l'Université de Kasetsart, à Bangkok, sous la direction de Marc Desquesnes, chercheur au CIRAD.

### **1.3. Thématique**

Le but de la recherche est d'étudier la diversité des trypanosomes chez les rongeurs et chez le bétail et de tenter d'établir l'existence de transmissions entre ces deux groupes d'hôtes. Pour ce faire, des échantillons de rongeurs obtenus au Cambodge lors de précédentes missions de CERoPath ont été utilisés. Une mission de terrain au Laos a été réalisée et une mission de terrain en Thaïlande a permis de prélever dans une même zone, des échantillons à la fois sur les rongeurs et sur les bovins. L'hypothèse qui veut être testée ici, est que les rongeurs peuvent être un réservoir de *T. evansi* pour le bétail.

Pour réaliser notre étude, différentes analyses ont été réalisées, de manière à pouvoir comparer différents outils de diagnostic. Nous avons donc effectué des examens parasitologiques directs, des analyses sérologiques et des PCR (Polymerase Chain Reaction).

Pour mieux appréhender la morphologie de *Trypanosoma lewisi*, des rats de laboratoire ont été utilisés pour cultiver et isoler le parasite, et mettre au point des outils de diagnostic sérologiques spécifiques pour cette espèce.



# MATERIELS ET METHODES

## 2.1. Missions de terrain rongeurs

### 2.1.1 Captures

Les localités d'investigation des missions de terrain du projet Ceropath sont choisies par rapport au gradient de déforestation et de pression humaine : deux missions sont prévues pour chaque site, une pendant la saison sèche (février-avril) et une pendant la saison des pluies (juin-septembre).

À chaque mission, nous suivons le protocole établi pour le piégeage, sachant que nous avons besoin de prélever du sang non coagulé, nous utilisons des pièges pour capturer les rongeurs vivants, à l'aide des différents appâts. Après plusieurs essais, les meilleurs résultats ont été obtenus avec des bananes, du maïs et du manioc.

Les pièges sont posés en ligne droite, à 5 m de distance l'un de l'autre ; chaque ligne est composée de 10 pièges, elle reste en place pendant 4 nuits. Le but est de les positionner dans quatre types de paysages différents (terres cultivées non inondables, forêts, villages et maisons isolées, zones humides ou irriguées) de manière à couvrir les principales niches écologiques des rongeurs.



**Figure 4 : Lieux de piégeage rongeurs, mission Paksé, Laos, avril 2009.**

Il est nécessaire d'entrer en contact avec les agriculteurs locaux, pour avoir la permission d'opérer sur leur terrain où dans leur village, et accessoirement éviter le vol de piège. En Asie, les rongeurs sont souvent chassés pour la consommation humaine. Nous pouvons recourir à l'aide des chasseurs,

qui connaissent bien les habitats des rongeurs et leur mode de capture. Les pièges sont laissés dans le village et relevés tous les matins pour récupérer les éventuels animaux capturés.

### 1.1.3 Dissection et prélèvements

Chaque matin les équipes partent sur les lignes et chez les chasseurs pour vérifier l'éventuelle présence de rongeurs dans les pièges. Les animaux sont amenés au laboratoire où ils sont euthanasiés, identifiés, mesurés et disséqués. Le laboratoire de terrain doit être installé dans un endroit éloigné des habitations et des animaux domestiques ; nous avons besoin d'eau courante et d'électricité.

Les cages sont laissées à l'extérieur pour ne pas contaminer le laboratoire et le personnel avec l'aérosol excrété par les rongeurs ; le personnel doit se protéger avec des gants, un masque et une blouse lors de l'entrée au laboratoire.

Pour chaque animal est prévue une fiche sur laquelle un opérateur va noter le code identifiant l'individu et toutes les données saisies pendant la dissection, dont les mesures, afin de constituer une base de données morphologiques de tous les rongeurs piégés.

L'euthanasie est effectuée en poussant l'anesthésie jusqu'à la mort. Dans un récipient résistant au chloroforme, capable de contenir deux pièges et fermant hermétiquement, du chloroforme est ajouté ; puis, les cages avec les animaux à l'intérieur y sont placées. Après 1 à 2 minutes l'état de l'animal est surveillé. L'animal n'est manipulé qu'en l'absence de respiration.

Pour récolter les ectoparasites, un morceau de papier est placé sous le piège avant l'euthanasie. Cela permet de récupérer les parasites qui tombent. Ceux qui restent



*Figure 5.: Pièges utilisés lors des missions de capture*

sur les rongeurs sont collectés par l'opérateur. Ils seront mis dans un tube avec de l'alcool pour différentes études concernant la morphologie et la génétique, ou dans un tube sec pour isoler les pathogènes (qui sera conservé dans l'azote liquide).

L'animal doit être pesé avant de commencer la dissection : il faut utiliser une balance avec une précision au décigramme.

Pour mieux évaluer l'âge des animaux et pouvoir ainsi distinguer les juvéniles des subadultes (les individus ne possédant pas encore toutes les caractéristiques du stade adulte) et des adultes, les organes sexuels sont observés. Chez les femelles nous observons le vagin pour savoir s'il est perforé ou non, et la formule mammaire, en indiquant le nombre de tétines pectorales, post-axillaires et inguinales et si elles sont bien visibles ou pas. La disposition et le nombre de tétines sont aussi des critères pour distinguer les espèces. Chez les males, nous indiquons si les testicules sont abdominaux (= juvénile), ou descendus dans le scrotum (= adulte). Après la dissection nous observerons le développement des vésicules séminales et nous mesurerons la longueur des testicules.

Le premier prélèvement à effectuer est le sang : l'animal est positionné et fixé sur le dos par des aiguilles sur une planche en polystyrène, l'abdomen et le thorax sont nettoyés avec de l'alcool. Une ponction cardiaque est réalisée le plus vite possible afin d'éviter la coagulation du sang. Le sérum sera séparé par centrifugation, à une vitesse de 9000 rotations par minute (rpm) pendant 5 minutes. Le sérum et le pellet de sang sont conservés dans l'azote liquide.

Après la ponction cardiaque, nous procédons aux prélèvements des organes. Pour facilement distinguer les tubes pour les différents organes, nous utilisons des « pastilles » colorées. Pour les poumons, les reins et la rate nous prélevons deux échantillons : un est mis dans un tube sec stocké dans l'azote liquide, et l'autre dans un tube avec 1 ml de « RNA Later » qui sera stocké à température de réfrigération (4°C).

Le RNA Later est un réactif aqueux de stockage des tissus qui protège et stabilise l'ARN des prélèvements frais : nous ne sommes plus obligés de les analyser tout de suite ou de les congeler mais nous pouvons les garder jusqu'à une



Figure 6 : Prélèvement des organes lors des sacrifices.

semaine à température ambiante (25°C), 1 mois à température de réfrigération (4°C), et indéfiniment à -20°C et -80°C.

Pour le foie, nous utilisons deux tubes avec de l'alcool absolu (conservation ADN); pour le diaphragme un seul échantillon dans un cryotube. Le tube digestif est conservé dans l'alcool dans un tube Falcon, pour dissection ultérieure et prélèvements des helminthes intestinaux.

Les prélèvements des poumons seront ensuite utilisés pour l'isolement des Hantavirus et des champignons (*Pseudocystis* spp) ; ceux de la rate pour l'isolement des *Rickettsia* (scrub typhus, murine typhus) ; ceux des reins pour *Leptospira*, ceux du foie pour la génétique d'hôte et pour les kystes de cestodes, le diaphragme pour la recherche de *Trichinella*, et l'intestin pour la recherche des nématodes, trématodes, acanthocéphales et cestodes.

La paroi musculaire abdominale est coupée à partir de la partie inguinale, devant l'ouverture génitale, jusqu'à la cavité thoracique, en soulevant la peau avec les pinces pour éviter d'endommager les organes. Nous découpons deux échantillons des poumons, un pour chaque tube.

L'ablation de la rate est réalisée en totalité, en la dégageant des tissus autour (ligaments et tissus séreux) : la rate est posée sur un papier filtre pour la peser avec une balance de précision au milligramme. Cette mesure peut fournir des informations sur le statut d'immunocompétence de l'individu. La rate est découpée en deux morceaux, déposés dans deux tubes (cryotube et RNA later).

Le tube digestif est prélevé, de l'estomac aux intestins : cela rend aussi plus facile le repérage des autres organes.

Les reins sont en suite prélevés : celui qui va être conservé dans le tube avec le RNA Later doit être coupé pour permettre au réactif de pénétrer dans le tissu correctement.

Le foie doit être bien observé pour chercher d'éventuels kystes de parasites : dans ce cas, nous prélevons la partie de tissu intéressé, en plus des deux échantillons prévus et conservés en alcool.

Pour finir un morceau du diaphragme est découpé et placé dans un cryotube.

Nous observons les organes génitaux pour compléter leur caractérisation : chez les femelles le nombre d'embryons éventuels est noté. Chez les males nous mesurons les testicules en exerçant une

pression sur le scrotum pour les faire sortir s'ils sont descendus. Le développement des vésicules séminales est noté.

### **2.1.3.Mesures**

Il est important que tous les operateurs agissent de la même manière pour ne pas avoir des biais dans les mesures : il est souhaitable que ceux qui n'ont pas d'expérience travaillent en binôme sur les premiers animaux.

Pour mesurer la longueur du corps et de la tête, de la queue, de la patte et de l'oreille nous utilisons une règle en millimètres; pour le crâne et pour les testicules, nous utilisons un « vernier caliper ».

Pour mesurer la longueur du corps et de la tête, nous nous assurons que l'animal soit allongé bien droit sur le dos : nous posons une épingle au but du nez, l'autre au niveau de l'anus. Chez le mâle, il peut être nécessaire de soulever le scrotum pour mieux rendre visible l'anus. Nous déplaçons l'animal et nous mesurons la distance entre les deux épingles, sur la planche de dissection.

Pour la queue nous agissons de la même façon : nous mesurons de l'anus au but de la queue, sans tenir compte des poils terminaux. Si la queue est coupée ou endommagée, nous le notons sur la fiche de l'individu.

Pour la patte, nous mesurons du talon à la pointe du doigt du milieu, sans considérer la griffe.

Pour l'oreille, nous positionnons l'extrémité de la règle au niveau de la base du pavillon auriculaire et nous mesurons jusqu'à l'extrémité libre. Nous notons d'éventuels dommages ou si l'oreille est coupée.

Pour le crane, nous positionnons une pointe du vernier caliper au niveau de l'os occipital et l'autre à l'extrémité de l'os nasal.

De la même façon, nous mesurons la longueur d'un testicule.

## 2.2 Mission de terrain bétail

Pendant la mission de terrain CERoPath à Buriram, un échantillonnage chez les bovins (vaches et buffles) a été planifié, pour pouvoir comparer les souches des trypanosomes détectés chez rongeurs et bétail qui partagent le même habitat.

Les lignes pour le piégeage des rongeurs ont été posées selon le protocole précédemment exposé. Les éleveurs ont été contactés à l'aide du personnel de la DLD (Department of Livestock Development) et pendant quatre jours, des prises de sang ont été effectuées chez le bétail, pour un total de 328 animaux dans 65 fermes.



**Figure 7 : Prélèvement de sang de buffles pendant la mission de terrain à Buriram, Thaïlande, juin 2009.**

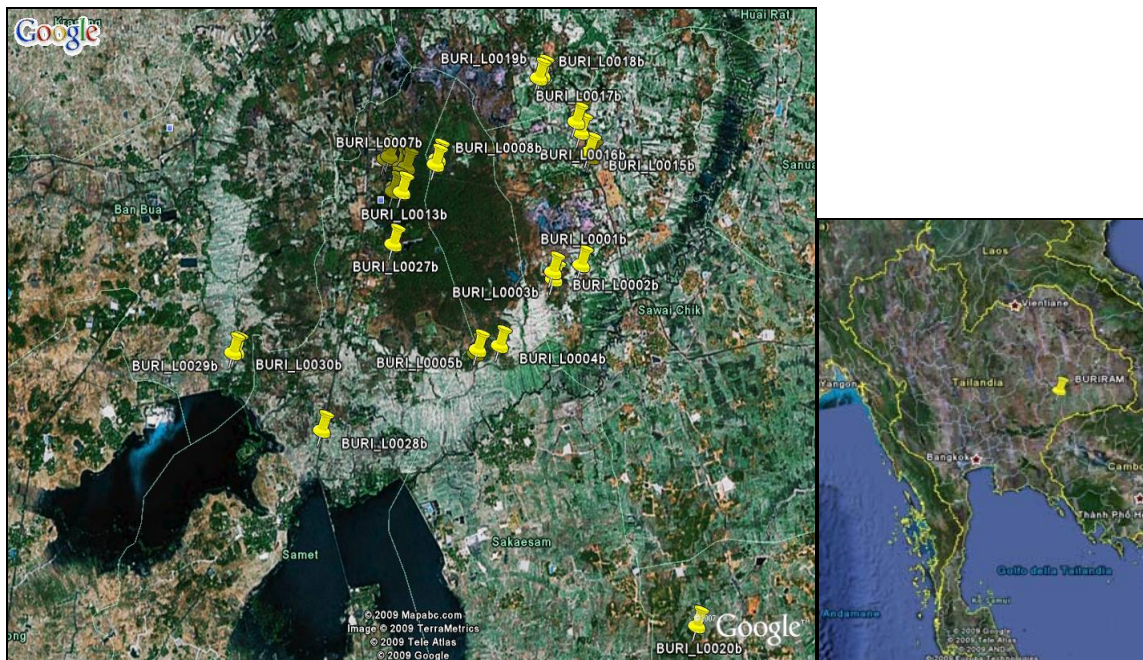
Les échantillons, deux par animal, un dans un tube sec et un dans un tube avec anticoagulant, ont été conservés à température de réfrigération (4°C) avant d'être analysés.

Un examen parasitologique direct a été effectué le jour même du prélèvement ; la technique de centrifugation en tube hématocrite et observation de l'interface sang/plasma en tube capillaire (méthode de Woo, 1969), a été choisie. Elle permet la détection de  $10^3$  trypanosomes par millilitre



de sang (Betancourt, 1979 ; Desquesnes 1995). L'hématocrite a été calculé pour détecter un éventuel état anémique de l'animal.

Dans le cas d'une parasitémie importante, des cryotubes avec 150 µl de sang et 150 µl de cryostabilisant ont été conservés dans l'azote liquide, afin de cultiver le parasite sur des rats de laboratoire et en identifier la souche.



**Figure 68 :** Carte de distribution des lignes de piégeage des rongeurs pour la mission CERoPath à Buriram, juin

2009.

Les échantillons ont été amenés à Bangkok, aux laboratoires de l'université de Kasetsart, Faculté de Médecine Vétérinaire, pour les tester avec la technique ELISA (« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »), le test CATT (« Card Agglutination Test for Trypanosomoses ») et la PCR. Les souches isolées avec les cryostats ont été inoculées chez des rats et des souris de laboratoire pour en étudier la morphologie.

## 2.3. Analyses sérologiques

### 2.3.1 CATT – Card Agglutination Test for Trypanosomoses - *T. evansi*

L'infection avec *Trypanosoma evansi* provoque la production d'anticorps circulants dirigés contre plusieurs antigènes de surface du parasite. Ces anticorps peuvent être mis en évidence dans le plasma ou dans le sérum de l'hôte infecté avec une agglutination directe.

Le CATT utilise comme antigène une suspension congelée et déshydratée des formes sanguines purifiées, colorées et fixées des trypanosomes. Ceux-ci expriment un antigène variable présent de façon prédominante (VAT= Variable Antigen Type) chez *Trypanosoma evansi* : RoTat 1/2. Ce VAT a été démontré comme étant exprimé par toutes les souches de *T. evansi* examinées (Verloo et al, 1997).

Le CATT *T. evansi* n'est pas spécifique d'espèce : une cross-réactivité avec d'autres trypanosomes est possible. Des faux positifs peuvent être dus à cette cross-réactivité. Comme précédemment rappelé, *T. evansi* est le seul trypanosome pathogène de ce groupe présent en Thaïlande, donc ce problème ne devrait pas se présenter. Il conviendra de vérifier qu'il ne donne pas de faux-positifs par réaction avec *T. lewisi*, ce dernier appartenant au groupe des Stercoraria.

Le VAT exprimé par l'antigène utilisé dans le test est un VAT de surface : ceux-ci sont les premiers à stimuler la réponse immunitaire, car en contact direct avec l'hôte. Les immunoglobulines M (IgM) sont les premières à être produites : ces anticorps polyvalents sont les responsables de la réaction d'agglutination qui est à la base du CATT. Les IgM ne persistent pas longtemps mais elles sont remplacées par les immunoglobulines « tardives », les IgG. Le CATT est capable de détecter les infections récentes, et une positivité témoigne une circulation sanguine du parasite depuis peu de temps. Le test a donc une faible sensibilité pour les infections chroniques, et pour les porteurs sains, qui ont déjà élaboré une réponse immunitaire complète.

Le sérum ou le plasma sont dilués dans le CATT buffer (PBS, Phosphate Buffered Saline, au pH7.4) : les échantillons des rongeurs et du bétail ont été dilués au quart pour notre étude, comme suggère Verloo (2000) pour avoir la sensibilité la plus élevée. Le sérum dilué (25 µl) est mis sur une



carte plastifiée et mélangé avec une goutte d'antigène reconstitué (45 µl). La même chose est faite avec un contrôle positif et un contrôle négatif pour comparer les résultats et vérifier le bon fonctionnement du test. La carte est ensuite posée sur un agitateur à 70rpm pendant 5 minutes, avant de pouvoir observer l'éventuelle agglutination.

Le CATT présente plusieurs avantages : il utilise une souche standardisée, ce qui permet une bonne reproductibilité du test, il est facile d'exécution et d'interprétation, faisable même sur le terrain. Il ne faut pas oublier, par contre, que son coût n'est pas négligeable (0,5€/test).

Un total de 629 échantillons de rongeurs a été testé, provenant de 6 sites des 3 pays du projet CERoPath. Les 328 échantillons du bétail, provenant de la mission de Buriram, ont été également testés.

### **2.3.2. ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**

Cette technique permet de détecter les anticorps dirigés contre les antigènes solubles du parasite

Pour démontrer la présence d'anticorps spécifiques, l'antigène est adsorbé sur une plaque en polystyrène : le sérum à tester est ensuite ajouté, suivi par un antisérum (anti IgG) conjugué avec un enzyme. Entre un passage et le suivant la plaque est rincée plusieurs fois. S'il y a présence d'anticorps, ils iront se fixer sur l'antigène, et le complexe substrat-chromogène donnera une densité optique détectable avec le lecteur des plaques ELISA.

La détection des immunoglobulines dirigées vers les trypanosomes démontre qu'il y a eu une infection, mais ces anticorps peuvent persister après la disparition du parasite : donc la positivité de ce test n'est pas une preuve d'infection en cours.

Pour effectuer le test ELISA, l'antigène de *T. evansi*, préparé selon le protocole de Desquesnes et al. (2009), est solubilisé dans un tampon carbonate. Il est fixé sur des plaques *Polysorb Nunc*® 96 puits (Nunc, Roskilde, Danemark), et laissé à incuber pendant une nuit. Après un rinçage, les plaques sont bloquées avec une solution de PBS et lait écrémé. Avant d'ajouter les sérums dilués, les puits sont lavés avec une solution de PBS et Tween 20® (Sigma®, Saint Louis, USA). Un conjugué-peroxydase anti IgG de bovin ou de rat, selon le cas, est ensuite ajouté : pour les espèces apparentés ou proches entre elles, comme bovin et buffle, le même réactif peut être utilisé (Luckins, 2004),

donc pour les bovins l'anti-bovin a été employé. Après un lavage, le complexe substrat/chromogène TMB est déposé dans les puits. La dernière étape consiste dans l'incubation dans une chambre noire avant de mesurer la densité optique de chaque puits de la plaque, à 620 nm de longueur d'onde. Le protocole utilisé dérive de celui décrit en 2007 par Desquesnes.

Le test ELISA *T. evansi* a été effectué sur les échantillons de bétail et sur ceux des rongeurs. Pour les bovins, le test a été standardisé précédemment (Desquesnes et al 2009). Pour les rongeurs, il n'y a pas de protocole standard ni de sérums de référence : il a été nécessaire d'adapter la composition des réactifs (voir le protocole en annexe). Les échantillons qui montraient la densité optique la plus forte ont été utilisés comme référence, aux côtés d'échantillons récoltés sur des rats de laboratoire (*Rattus norvegicus*) expérimentalement infectés par *T. evansi*. Pour éviter la mort prématurée des animaux, les rats ont été inoculés, traités et re-inoculés pour leur permettre de produire une importante quantité d'anticorps. En sachant que le conjugué utilisé est spécifique pour les rats domestiques, il n'existe pas de données par rapport à sa réactivité avec les espèces de rats sauvages testés dans cette étude.

En plus du conjugué anti-rat, la Protéine G et la Protéine A, deux protéines produites respectivement par des Streptocoques (groupes C et G), et par *Staphylococcus aureus* ont été évaluées. Ces protéines ont la capacité de lier la région constante des anticorps (Fc). La fixation de ces conjugués sur les immunoglobulines de rat n'ayant pas lieu, ces deux protéines n'ont pas été utilisées dans notre étude.

Le test ELISA *T. lewisi* a été mis au point avec un antigène préparé après isolement à partir d'un rat de laboratoire avec une parasitémie importante, selon la méthode décrite par Lanham (1970). Cette méthode prévoit le passage du sang de l'animal infecté à travers une colonne de DEAE-cellulose et se base sur la différence de charge électrique de surface entre les trypanosomes et les cellules sanguines pour les séparer. La cellulose adsorbe les cellules chargées négativement, mais les parasites, chargés positivement, restent en suspension et peuvent passer librement au long de la colonne.

Une différence de charge est présentée par les différentes espèces de trypanosomes, mais elle reste toujours assez dissemblable de celle des cellules hématiques pour permettre l'isolement. À cause de la charge plus négative de *T. lewisi* par rapport aux autres trypanosomes, différentes concentrations

du tampon ont été testées pour avoir la meilleure suspension des parasites. Les différentes concentrations donnent au tampon une force ionique plus ou moins élevée, et celle qui permet un meilleur isolement de *T. lewisi* est le PSG 6 : 4 (Phosphate Saline Glucose : 6 parties de PS et 4 d'eau distillée, avec une concentration finale de 1% de glucose).

Les parasites récoltés sont ensuite lavés par centrifugation, et le pellet résultant est re-suspendu ; après des cycles de congélation et décongélation, le lysat est passé au sonicateur et centrifugé. L'absorbance à 260nm du surnageant est lue avec le spectrophotomètre pour estimer la concentration en protéines et pouvoir l'utiliser comme antigène pour le test ELISA. (Voir protocole pour l'isolement en annexe)

## **2.4. PCR – Polymerase Chain Reaction**

Un morceau d'ADN dont la séquence nucléotidique est connue, au moins en partie, est amplifié à l'aide de deux amorces capables de s'apparier spécifiquement aux deux extrémités de la séquence cible, à chacun des brins d'ADN. A partir de ces amorces, une copie de chaque brin est effectuée par un enzyme thermostable, la Taq-polymérase, pour avoir le double du nombre initial de la portion d'ADN concernée. Plusieurs cycles d'augmentation et réduction de la température (entre 20 et 40) amènent à une amplification exponentielle des portions d'ADN désirées. Une électrophorèse en gel d'agarose est effectuée avec les produits de l'amplification, qui sont mis en évidence par le bromure d'éthidium avec l'irradiation des rayons ultraviolet (Chippaux 1991). La taille spécifique des produits de la PCR est comparée avec la migration d'un marqueur moléculaire et d'un contrôle positif ; un contrôle négatif est également utilisé pour détecter une éventuelle contamination.

Pour pouvoir identifier les parasites, la cible d'élection de l'amplification est souvent une série de gènes présents en grand nombre de copies dans le génome : l'amplification de la séquence sera beaucoup plus importante et le test beaucoup plus sensible, que si elle avait comme objet un gène exprimé en une seule copie (Mac Leod, 1997). Les mini-chromosomes de l'ADN nucléaire, contenant de l'ADN satellite, ont été mis au point en premier pour l'identification d'espèce des trypanosomes pathogènes. Ils rendent possible la détection même de petites quantités d'ADN, avec une sensibilité très élevée (Masiga 1992 ; Artama 1992). L'ADN des maxi-cercles kinétoplastiques

est utilisé pour la détection spécifique de *T. evansi* et *T. cruzi* ; les gènes mini-exon de l'ADN nucléaire ont été choisis pour *T. vivax* et *T. cruzi* (Desquesnes et Davila, 2002).

#### 2.4.2. Les amorces utilisées

- **TRYP 1 :** De séquence (5'CGTCCCTGCCATTTGTACACAC 3', 3'GGAAGCCAAGTCATCCATCG 5'). Ces amorces ont comme cible la séquence d'ADN ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) : en étant présent en plusieurs exemplaires dans le génome (200-500), elle est facilement amplifiée même en partant d'une petite quantité d'ADN. Sa taille est variable (300-800 pb) même entre espèces strictement corrélées ; elle est en revanche conservée dans la même espèce. Cela permet de distinguer et d'identifier les trypanosomes présents dans un échantillon, et donc de détecter des infections multiples (Desquesnes, McLaughlin et al, 2001). Pour *T. evansi* le poids attendu du produit est de 520bp ; pour *T. lewisi* 623bp (Desquesnes, Ravel et al, 2002).
- **TBR :** De séquence (TBR1 5'GAATATTAAACAATGCGCGCAG 3', TBR2 5'CCATTTATTAGCTTTGTTGC 3'). Ce couple d'amorces amplifie une séquence d'ADN satellite hautement répétitive (10.000-20.000 copies), et Masiga (1992) s'est appuyé sur le génome de *T. brucei* pour les dessiner. Le but de son étude était de détecter de façon certaine les différentes espèces de trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon*. Ces amorces ont une sensibilité de  $10^{-3}$  ng d'ADN dans le sang (Masiga et al., 1992; Fernández D., 2008) et de  $10^{-6}$  ng si on utilise des parasites purifiées. Les produits ayant migrés sur le gel donnent une bande de 177pb ainsi que des bandes multiples de 177pb du au fait que la cible de l'amplification est présente plusieurs fois successives dans le génome.
- **ESAG:** De séquence (TE2249: 5' CAACGACAAAGAGTCAGT 3', TE2250: 5' ACGTGTTTTGTGTATGGT 3') (Artama, 1992). Ces amorces sont spécifiques pour le sous-genre *Trypanozoon* (d'après Braem, 1999, cité par Holland, Claes 2001). Elles ont comme cible un morceau d'ADN génomique multi copies codant pour un complexe du récepteur de la transferrine chez *T. evansi* ; son poids est 237pb.

### 2.4.2. Préparation de la PCR

L'ADN des échantillons a été extrait au Phénol-Chloroforme, comme décrit en annexe. La PCR a été effectuée dans un mélange de 22 µl contenant 10 mM de tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 200 mM de chacun des 4 désoxyribonucleotides triphosphates (dNTPs), 1 µl de chaque amorce, 0,5 unités de Taq Polymérase, 0,5% de DMSO, eau distillée et 2 µl de ADN.

Les cycles ont différentes durées et températures pour les réactions avec les deux amorces. Pour les amorces TRYP1, 30 cycles ont été réalisés : la dénaturation initiale à 94°C pendant 30 secondes, est suivie de 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, 30 secondes à 72°C avec une extension finale de 30 secondes à 72°C. Pour les amorces TBR, les 30 cycles totaux sont précédés d'une dénaturation initiale à 94°C pendant 60 secondes, suivie de 30 secondes à 94°C, 60 secondes à 60°C, 30 secondes à 72°C et une extension finale de 120 secondes à 72°C.

Les produits ont été observés sous lampe UV à l'aide du bromure d'éthidium, après migration sur gel d'agarose 2%.

Chez les rongeurs, le premier lot testé était constitué des échantillons choisis par rapport à leurs résultats au test CATT : 20 positifs et 20 négatifs, provenant de plusieurs sites. Après cette première analyse, les échantillons du deuxième lot proviennent du site de Mondolkiri, Cambodge, récoltés pendant la mission de mars 2009. Il s'agit d'une localité soumise à grands changements environnementaux récents, avec une importante déforestation, une forte densité humaine et le développement de plusieurs cultures. La bonne biodiversité est témoignée par le piégeage de 9 espèces différentes de rongeurs, pour un total de 128 animaux.

L'ADN de 100 échantillons a été extrait avec la méthode Phénol-Chloroforme: pour l'espèce *Bandicota savilei*, très abondante dans cette mission, 30 individus ont été considérés suffisants pour les analyses prévues.

Dans le cadre de l'Université de Kasetsart, à Bangkok, un piégeage a été effectué à l'intérieur des bâtiments : ils constituent le troisième lot. Ces échantillons de sang des rongeurs ont été testés en PCR, avec les amorces TRYP1 et TBR, après examen direct.

Sur les échantillons des bovins récoltés à Buriram, pendant la mission de terrain rongeurs-bovins du juin 2009, des PCR avec les deux jeux d'amorces TRYP1 et TBR vont être exécutés.

Afin de confirmer de manière certaine les positifs qui présentent le poids moléculaire classique, un séquençage sera effectué pour vérifier leur homologie avec les séquences de *T. lewisi* et *T. evansi*. De la même façon, les séquences des échantillons qui donnent des produits de poids inattendus seront comparés avec celles présentes dans GenBank afin de savoir à quel parasite ils s'apparentent.

# RÉSULTATS

Les données traitées sont relatives aux dix premières missions du projet CERoPath :

- Novembre 2007 : Loei, Thaïlande.
- Février 2008 : Loei, Thaïlande ; Veal Renh, Cambodge.
- Juin 2008 : Nan, Thaïlande.
- Juillet 2008 : Luang Prabang, Laos.
- Novembre 2008 : Buriram, Thaïlande ; Veal Renh, Cambodge.
- Mars 2009 ; Mondolkiri, Cambodge.
- Avril 2009 : Paksé, Laos.
- Juin 2009 : Buriram, Thaïlande.

Le projet est basé sur la collaboration entre différents instituts de recherche de plusieurs pays. Ils doivent se coordonner et organiser les déplacements des échantillons. Dans le cas de cette étude, les sérums sont partagés entre l'Institut Pasteur de Phnom Penh, au Cambodge, et l'université de Kasetsart, Thaïlande. Malheureusement, pour certains sites les prélèvements n'étaient pas en quantité suffisante pour être soumis aux analyses prévues dans les deux Pays. L'intégralité des échantillons n'a pu être analysée.

## THAÏLANDE

Espèce rongeur	Localité	Nombre	CATT	ELISA
<i>Bandicota indica</i>	Nan	83	76 -	
<i>Bandicota sp.</i>	Nan	2	2 -	
<i>Berylmys berdmorei</i>	Nan	9	1 +/-; 8 -	
<i>Berylmys bowersi</i>	Nan	4	4 -	
<i>Mus caroli</i>	Nan	1	/	
<i>Mus cervicolor</i>	Nan	19	10 -	
<i>Mus fragilicauda</i>	Nan	1	1 -	
<i>Mus sp.</i>	Nan	22	15 -	
<i>Rattus exulans</i>	Nan	41	13 -	
<i>Rattus tanezumi</i>	Nan	20	18 -	
TOT		202	1 (+/-) /149	

Tableau 1 : Résultats du piégeage de la mission du 06/2008 à Nan.

Espèce rongeur	Localité	Nombre	Nombre2	CATT	ELISA
		11/2007	02/2008		
<i>Bandicota indica</i>	Loei	1	14	serums non disponibles	
<i>Bandicota savilei</i>	Loei	/	9	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Bandicota sp.</i>	Loei	/	17	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Berylmys berdmorei</i>	Loei	3	8	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Berylmys bowersi</i>	Loei	5	22	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Cannomys badius</i>	Loei	/	1	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Chiropodomys gliroides</i>	Loei	/	2	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Crociodura tenuata</i>	Loei	/	1	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Hapalomys longicaudatus</i>	Loei	/	1	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Leopoldamys edwardsi</i>	Loei	1	6	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Leopoldamys sp.</i>	Loei	/	6	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Maxomys sp</i>	Loei	/	13	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Maxomys surifer</i>	Loei	14	9	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Mus caroli</i>	Loei	/	2	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Mus cervicolor</i>	Loei	/	1	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Mus cookii</i>	Loei	8	3	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Mus shortridgei</i>	Loei	/	1	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Mus sp.</i>	Loei	10	103	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Niviventer fulvescens</i>	Loei	1	2	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Niviventer sp</i>	Loei	5	64	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Rattus exulans</i>	Loei	5	49	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Rattus losea</i>	Loei	1	82	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Rattus losea ou Bandicota</i>	Loei	/	4	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Rattus sp.</i>	Loei	1	2	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Rattus tanezumi</i>	Loei	/	33	<a href="#">serums non disponibles</a>	
<i>Tupaia glis</i>	Loei	1	/	<a href="#">serums non disponibles</a>	
TOT		56	455		

Tableau 2 : Résultats du piégeage des missions du 11/2007 et du 02/2008 à Loei.

Espèce rongeur	Localité	Nombre	Nombre2	CATT	PCR
		06/2009	11/2008		
<i>Bandicota indica</i>	Buriram	1	23	23-, 1+	
<i>Bandicota savilei</i>	Buriram	1	/	/	
<i>Menetes berdmorei</i>	Buriram	/	1	/	
<i>Mus caroli</i>	Buriram	36	/	3-	
<i>Mus cervicolor</i>	Buriram	33	9	11-, 1+/-	
<i>Rattus exulans</i>	Buriram	35	39	54 -, 1+	1+ <i>T. lewisi</i>
<i>Rattus losea</i>	Buriram	1	/	/	
<i>Rattus tanezumi</i>	Buriram	25	13	29-	
TOT		132	85	2+, 1(+/-)/123	1+ <i>T. lewisi</i>

Tableau 3 : Résultats du piégeage de la mission du 11/2008 et 06/2009 à Buriram.

Animaux	Localité	Nombre	CATT	ELISA	PCR
<i>Buffles Bubalus bubalis</i>	Buriram	67	8+, 6+/-	1 +, 66-	
<i>Vaches</i>	Buriram	261	56+, 10+/-	5 +, 206-	
TOT		328	64+, 16+/-/328	6+/278	

Tableau 4 : Résultats de l'échantillonnage sur le bovins à Buriram, mission du 06/2009.



## LAOS

Espèce rongeur	Localité	Nombre	CATT	PCR
<i>Bandicota indica</i>	Luang Prabang	2	/	
<i>Berylmys berdmorei</i>	Luang Prabang	1	1-	
<i>Berylmys bowersi</i>	Luang Prabang	2	/	
<i>Crocidura sp.</i>	Luang Prabang	1	1-	
<i>Mus caroli</i>	Luang Prabang	9	4-	
<i>Mus cookii</i>	Luang Prabang	49	16-	
<i>Mus sp.</i>	Luang Prabang	52	35	
<i>Rattus nitidius</i>	Luang Prabang	9	/	1+ <i>T. lewisi</i> , 1-
<i>Rattus sp</i>	Luang Prabang	16	6-, 1+	
<i>Rattus tanezumi</i>	Luang Prabang	75	22-, 3+	1-
TOT		216	4+/89	1+/3

Tableau 5 : Résultats du piégeage de la mission du 07/2008 à Luang Prabang.

Espèce rongeur	Localité	Nombre	CATT	PCR
<i>Bandicota indica</i>	Paksé	1	1-	1-
<i>Berylmys berdmorei</i>	Paksé	2	2-	2-
<i>Maxomys surifer</i>	Paksé	2	2-	
<i>Mus caroli</i>	Paksé	1	1-	
<i>Niviventer fulvescens</i>	Paksé	1	1-	
<i>Rattus exulans</i>	Paksé	50	48-, 2+/-	3+ <i>T. lewisi</i> , 7-
<i>Rattus losea</i>	Paksé	10	7-, 3+	5-
<i>Rattus tanezumi</i>	Paksé	4	4-	2-
TOT		71	3+, 2(+/-)/71	3+/20

Tableau 6 : Résultats du piégeage de la mission du 04/2009 à Paksé.

## CAMBODGE

Especies rongeurs	Localité	Nombre	Nombre	CATT	PCR
		feb-08	nov-08		
<i>Berylmys berdmorei</i>	Veal Renh	/	6	5-, 1+	1-
<i>Maxomys sp</i>	Veal Renh	3	46	2-, 6+	3+ <i>T. lewisi</i> , 2-
<i>Niviventer sp.</i>	Veal Renh	/	1	1-	/
<i>Rattus argentiventer</i>	Veal Renh	114	11	56 -, 4+, 2 +/-	1-
<i>Rattus exulans</i>	Veal Renh	2	40	41-, 2+	2-
<i>Rattus rattus groupe IV Aplin</i>	Veal Renh	2	/	2-	/
<i>Rattus sp.</i>	Veal Renh	2	/	2-	/
<i>Rattus norvegicus</i>	Veal Renh	/	13	13-, 1+	1-
<i>Rattus tanezumi</i>	Veal Renh	4	31	34-, 4+, 1 +/-	2-
<i>Suncus murinus</i>	Veal Renh	/	24	24-, 4+	4-
TOT		127	172	22+, 3(+/-)/244	3+/-16

Tableau 7 : Résultats du piégeage des missions du 02/2008 et 11/2008 à Veal Renh.

Espèce rongeur	Localité	Nombre	CATT	PCR
<i>Bandicota indica</i>	Mondolkiri	1	/	1-
<i>Bandicota savilei</i>	Mondolkiri	51	1-	1+ <i>T. lewisi</i> , 29-
<i>Bandicota sp.</i>	Mondolkiri	3	/	3-
<i>Berylmys berdmorei</i>	Mondolkiri	1	1+/-	1-
<i>Leopoldamys sabanus</i>	Mondolkiri	2	/	2-
<i>Maxomys ?</i>	Mondolkiri	1	/	1-
<i>Maxomys sp</i>	Mondolkiri	1	/	1-
<i>Maxomys surifer</i>	Mondolkiri	14	1+, 1-, 1+/-	1+ <i>T. evansi</i> , 13-
<i>Mus caroli</i>	Mondolkiri	1	/	1-
<i>Niviventer fulvescens</i>	Mondolkiri	6	/	1+ <i>T. evansi</i> , 5-
<i>Rattus exulans</i>	Mondolkiri	25	1+, 7-	2+ <i>T. lewisi</i> , 23-
<i>Rattus tanezumi</i>	Mondolkiri	26	6-	1+ <i>T. evansi</i> , 25-
TOT		132	2+, 2(+/-)/19	3+ <i>T. lewisi</i> , 3+ <i>T. evansi</i> /100

Tableau 8 : Résultats du piégeage du 03/2009 à Mondolkiri (deuxième lot PCR).

Espèce rongeur	Localité	Nombre	Ex. direct	PCR (TBR)
<i>Rattus tanezumi?</i>	Kasetsart	9	9 -	3+
TOT		9 -	9 -	3+ <i>T. evansi</i> /9

Tableau 9 : Résultats du piégeage à l'université de Kasetsart (troisième lot PCR).

Le nombre total des animaux collectés pendant ces dix premières missions CERoPath est 1648 individus.

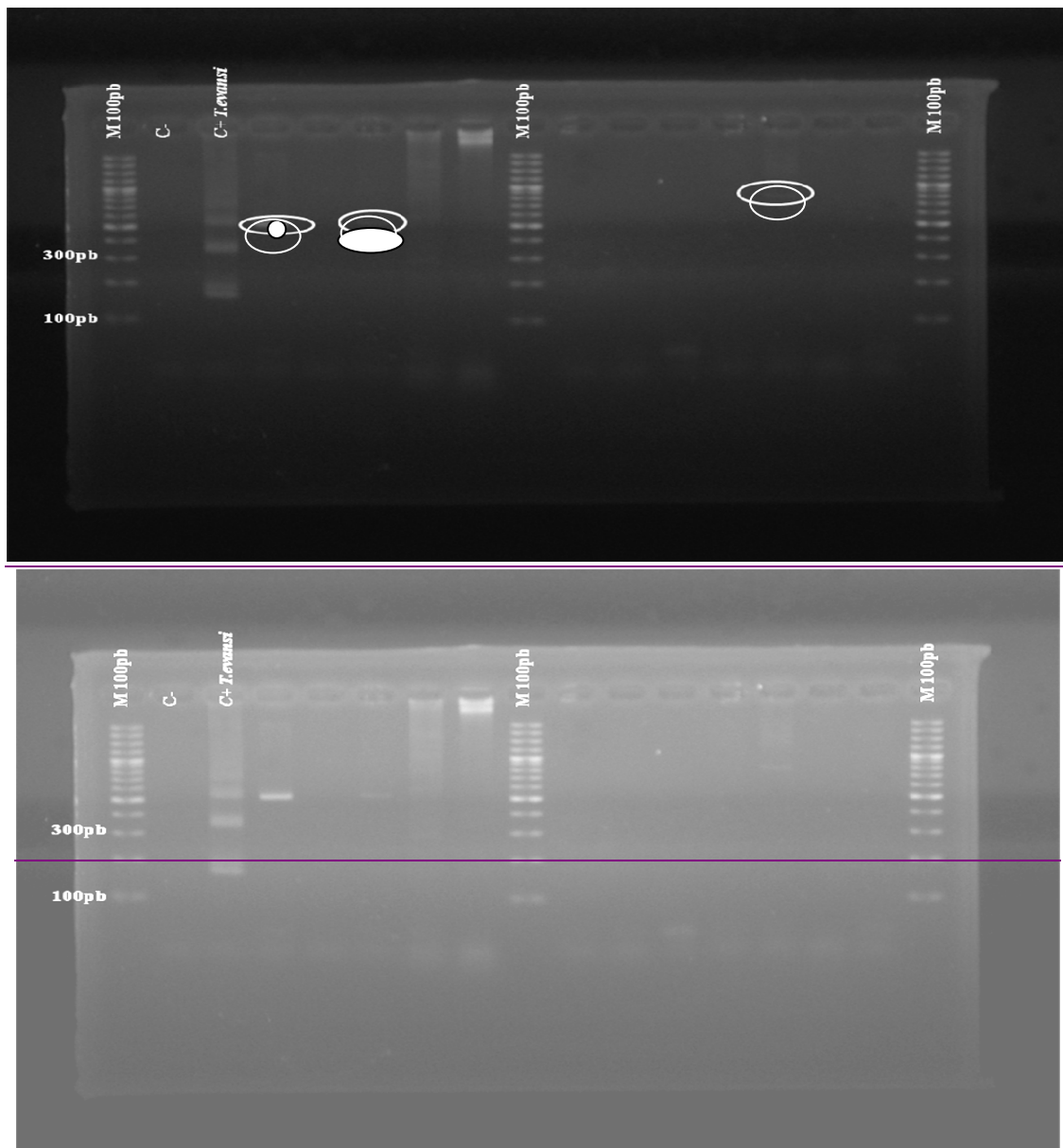
- Le test CATT a été effectué sur tous les sérums de rongeurs disponibles à Kasetsart, pour un total de 629 échantillons ; l'idée initiale était également de comparer les résultats des deux techniques sérologiques et de la PCR. – Le nombre de positifs est de 33 sur 629 échantillons testés.
- Pour ce qui concerne l'ELISA chez les rongeurs, les premières résultats n'ont pas été fiables. Malgré l'adaptation du protocole, et plusieurs manipulations effectués, les densités optiques (DO) obtenues avec un lot d'échantillons de référence n'étaient pas constantes. Le manque d'une DO constante pour les contrôles positifs, ne nous a pas permis d'interpréter les résultats ; que ce soit pour l'ELISA *lewisi* et pour l'ELISA *evansi*.
- Pour ce qui concerne la PCR, le premier lot de 40 échantillons a été testé avec trois amorces : TRYP1, ESAG et TBR. Les résultats avec ESAG n'étant pas interprétables, du à la présence de bandes continues sur le gel, cette amorce a été abandonné et n'a plus été utilisée pour les analyses suivantes. Donc les 100 échantillons du deuxième lot, de Mondolkiri, ont été testés avec deux amorces, TRYP1 et TBR.

Pour le premier lot des 40 échantillons, 7 produits ont le poids classique attendu pour *T. lewisi*. Il y en a 22 qui ont un poids inattendu, qui ne correspond ni à *T. lewisi* ni à *T. evansi*.

Parmi les 100 échantillons de Mondolkiri (deuxième lot), 37 « positifs » ont été détectés avec TRYP1: seulement 4 ont le poids moléculaire attendu pour la séquence de *T. lewisi*, et 4 celui attendu pour *T. evansi*. Les 29 échantillons restant ont montrés des signaux de 3 poids moléculaires inattendus : 700-750pb, 180pb, 450-500pb. Trois produits représentatifs de ces 29 échantillons ont été séquencés et la séquence comparée avec celles disponibles sur GenBank (BLAST : Basic Local Allignment Search Tool). Les Blasts ont révélé qu'une fraction (30-40% de la séquence soumise) des produits séquencés présentait des homologues (81-95%) avec des séquences présentes chez les rongeurs, mais pas chez des trypanosomes.

Avec les amorces TBR, 9 échantillons se sont révélés positifs ; 3 ont le poids attendu pour *T. evansi*, mais 6 autres produits ont un poids qui n'y correspond pas (500pb et 800pb) et sont le plus probablement également des produits non spécifiques. L'un d'entre eux d'un poids de 800bp a été séquencé et blasté, mais il n'a pas présenté de reconnaissance significative.

Parmi les rongeurs piégés à Kasetsart (troisième lot), 3 échantillons se sont révélés être positifs avec les amorces TBR, avec le poids moléculaire spécifique de *T. evansi*.



**Figure 9 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TBR sur les échantillons des rongeurs de Mondolkiri. Le poids des produits mises en évidence est supérieure à 177 pb : le deux premières se situent à 500 pb, le troisième entre 800 et 900 pb. M=Marqueur, C- = Control négatif, C+= Control positif.**

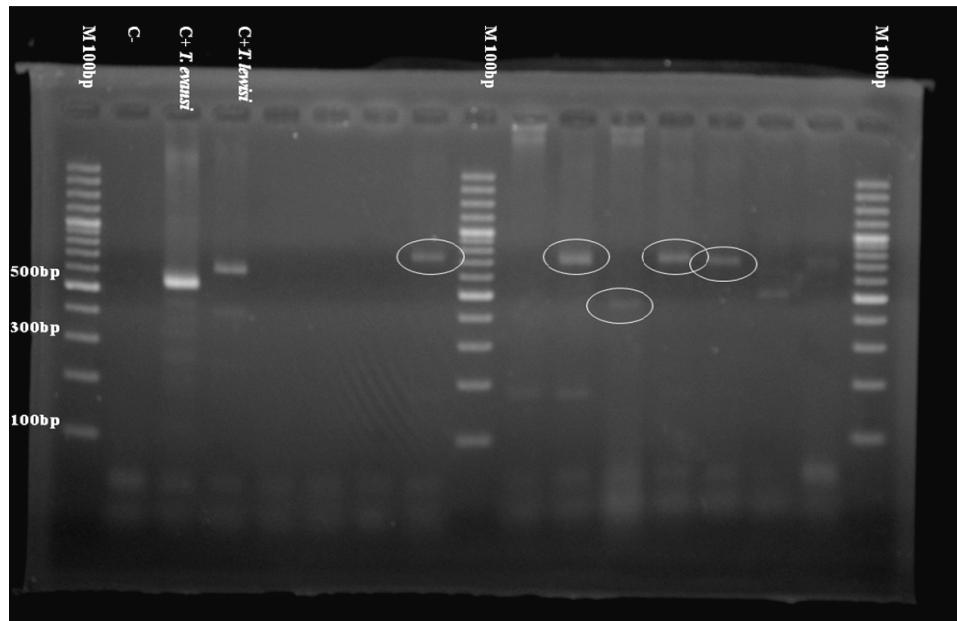


Figure 10 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TRYP1 sur les échantillons des rongeurs de Mondolkiri. Les produits mis en évidence ont un poids moléculaire qui ne correspond ni au control positif *evansi* ni au control positif *lewisi*.

M=Marqueur, C- = Control négatif, C+= Control positif.

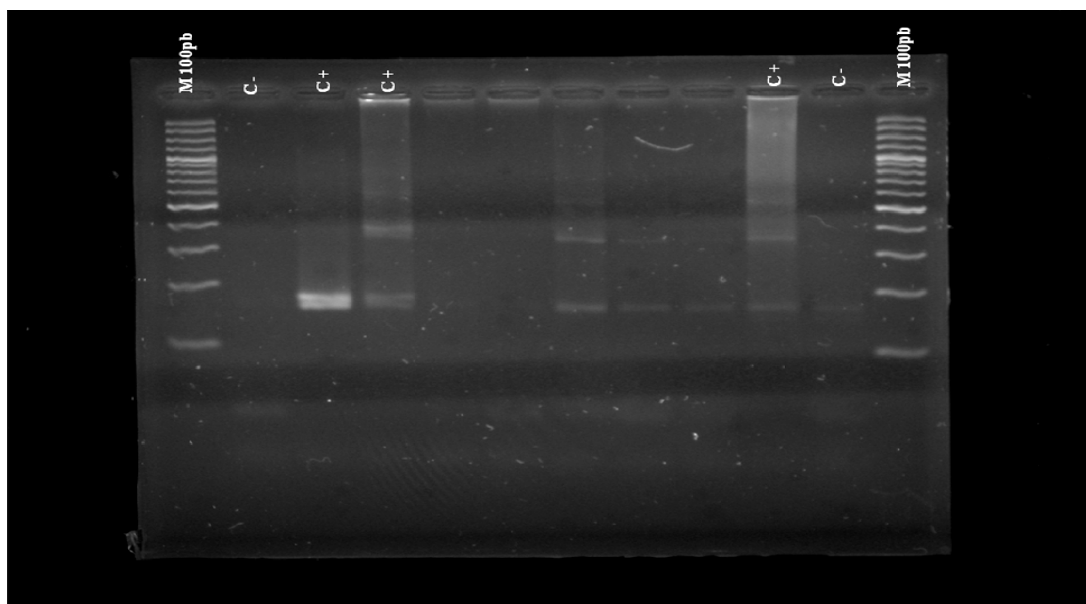


Figure 11 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TBR sur les échantillons des rongeurs de Kasetsart. Trois échantillons parmi les cinq testés donnent un produit positif pour *T. evansi*. M=Marqueur, C- = Control négatif, C+= Control positif.

- Sur les échantillons de la mission de Juin 2009 à Buriram, l'examen direct et les analyses sérologiques ont été effectuées. À l'examen direct, chez 5 rats nous avons pu identifier des trypanosomes morphologiquement ressemblant à *T. lewisi*. Des cryostables ont été préparés. L'un d'eux a été mis en culture et caractérisé par PCR (TRYP1), les séquençages ont permis de confirmer l'espèce *T. lewisi*. Chez les bovins, 20 animaux présentaient des microfilaires et 15 des trypanosomes qui, pour leur taille et leur morphologie ressemblaient à *T. theileri*.

Les échantillons de rongeurs ont été testés avec le CATT ; aucun des 45 sérums n'a donné un résultat positif. Trois cent vingt huit échantillons des bovins ont été testés avec l'ELISA et le CATT ; 64 étaient positifs et 16 douteux en CATT, et avec le test ELISA seulement 6 étaient positifs.

Des PCR sont en cours sur les échantillons des bovins qui se sont révélés être positifs à l'examen direct ou à l'ELISA.

## DISCUSSION

Le premier lot d'échantillons a été testé pour évaluer la fiabilité du test CATT: sur les 40 sérums, 20 étaient positifs avec le CATT, et 20 négatifs. Pour vérifier ces résultats, une PCR avec les deux amorces TBR et TRYP1 a été effectuée.

La PCR avec les amorces TBR, spécifiques pour *T. evansi*, aurait du confirmer la positivité de ces échantillons, mais au contraire aucun d'entre eux a donné le produit attendu de 177pb.

Les amorces TRYP1, capables de détecter spécifiquement les différentes espèces de trypanosomes, ont montré que 7 échantillons étaient positifs sur les 40 mais sur ces mêmes échantillons, seulement 3 étaient positifs en CATT. Cela peut s'expliquer par une réaction croisée (« cross-reactivity ») avec d'autres espèces de trypanosomes, même si l'antigène utilisé devrait pouvoir réagir qu'avec les trypanosomes du groupe des Salivaria, et pas avec *T. lewisi*, qui appartient au groupe des Stercoraria. Avec les amorces TBR, tous les échantillons ont été détectés comme négatifs : en sachant que 20 échantillons étaient positifs avec le test CATT, nous pouvons soupçonner que ces positifs soient en réalité des faux positifs.

Pour vérifier que le test CATT ne réagit pas avec *T. lewisi*, 8 échantillons de rats positif, car inoculés dans notre laboratoire, ou parce que positifs à l'examen direct, ont été testés. Aucun de ces échantillons n'a donné un résultat positif. Ceci confirme que le test CATT ne détecte pas comme positifs les individus infectés avec *T. lewisi* ; mais il faut découvrir la cause de cette réaction croisée pour pouvoir utiliser au mieux cet outil.

Les sérums de Mondolkiri n'étaient pas tous disponibles pour nos analyses : le test CATT a pu être effectué uniquement sur 19 échantillons sur le total de 132 individus. Les 2 échantillons ayant donné un résultat positif en CATT et un douteux n'ont pas donné un produit en PCR avec TBR. Avec les amorces TRYP1 la PCR n'a donné que des produits non spécifiques. Cela pourrait confirmer l'hypothèse de la cross-réactivité évoquée précédemment.

Le test CATT ne se montre pas d'une fiabilité suffisante pour être utilisé seul pour la recherche de rongeurs infectés avec *T. evansi*. C'est pour cela que son utilisation pour des enquêtes futures est à proscrire.

L'échantillonnage chez les bovins et chez les rongeurs pendant la mission de CERoPath à Buriram avait comme but de vérifier l'hypothèse selon laquelle les rongeurs seraient un possible réservoir de *T. evansi* pour les bovins.

Une étude menée au Brésil (Herrera et al, 2005) a montré que les rongeurs sauvages infectés par *Trypanosoma evansi* ne présentaient pas d'altération de l'hématocrite due à la parasitémie, observée chez le rat de laboratoire. Le parasitisme déclenche en fait une anémie importante (Rademaker et al, 2009). La parasitémie étant toujours faible, les auteurs suggèrent que le rôle des rongeurs sauvages dans la transmission de *T. evansi* est très limité. Ils pourraient éventuellement transmettre le parasite à des carnivores par ingestion. Toutefois, la parasitémie étant hautement variable d'une espèce à l'autre, l'hypothèse de réservoir sauvage « rongeurs » demeure en suspend.

Dans notre enquête, les résultats du CATT et de l'ELISA ne sont pas concordants : même si les deux tests ne détectent pas les mêmes immunoglobulines, et donc pas le même stade d'infection, la différence du nombre de positifs est étonnante. Ce nombre faible semble remettre en cause la circulation du parasite dans le site. Nos résultats ne nous semblent pas permettre de conclure sur ce point important de notre problématique.

Il faut rappeler que le site n'a pas été choisi par rapport à la prévalence de *T. evansi* chez les bovins, ni selon le nombre de rongeurs piégés pendant la mission précédente, mais sur la base du nombre important de bovins présents sur le site. Pour pouvoir mieux évaluer l'hypothèse formulée, nous proposons de procéder à un nouvel échantillonnage de rongeurs, sur un site avec une prévalence importante de *T. evansi* détecté chez les bovins.

Avec les amorces TRYPI, les seuls trypanosomes détectés sont *T. lewisi* et *T. evansi*, donc les seules qui circulent dans la zone de notre étude (Mondolkiri, Cambodge). Mais ces amorces se sont révélées ne pas être très spécifiques pour les trypanosomes : elles amplifient des produits qui ne proviennent pas de ces parasites. Les produits PCR qui n'ont pas les poids classiques ont donné des séquences qui ne correspondent pas au génome de trypanosomes (après blast sur GenBank).

Le séquençage effectué sur les produits de poids classique, 623 pb, a confirmé leur homologie avec *T. lewisi*. Par contre, les produits de poids différent ont donné une séquence qui est homologue avec des séquences des rongeurs. Ceci démontre que les amorces TRYP1 ne sont pas spécifiques pour les



trypanosomes, mais elles peuvent amplifier des séquences génomiques présentes dans l'hôte. Leurs produits ne sont pas toujours relatifs aux trypanosomes.

Ces amorces restent utiles pour les enquêtes chez les rongeurs car elles peuvent détecter des trypanosomes autres que *T. lewisi* et *T. evansi*. Un séquençage est requis pour confirmer les résultats.

Pour ce qui concerne la recherche de *T. evansi*, un éventuel produit de 520 pb avec les amorces TRYP1 peut être confirmé avec une PCR avec les amorces TBR. Seulement après avoir donné aussi le produit attendu de 177 pb, un échantillon pourra être considéré positif, sans besoin d'un séquençage, grâce à la spécificité des amorces TBR.

Les rongeurs piégés dans les bâtiments de Kasetsart ont été testés en PCR avec les deux jeux d'amorces, TRYP1 et TBR. C'est la première fois qu'une étude sur les trypanosomes circulant chez les rongeurs en Thaïlande utilise les amorces TBR, spécifiques pour *T. evansi*, pour confirmer ses résultats en TRYP1. Avec notre étude, la confirmation s'est révélée être indispensable pour pouvoir affirmer avec certitude la positivité d'un échantillon.

L'enquête du 2007 par Jittapalapong et al. a été effectuée seulement à l'aide des amorces TRYP1, mais l'hypothèse selon laquelle *T. evansi* est endémique chez les rats en Thaïlande est confirmée par nos résultats en TBR, sur les rongeurs positifs piégés à Kasetsart. Il faut considérer que la positivité à la PCR n'était pas associée à une positivité à l'examen direct, donc nous n'avons pas des informations par rapport à l'importance de la parasitémie de *T. evansi* chez les rongeurs.

## CONCLUSION

Les outils de diagnostic qui ont été utilisés dans cette étude ont permis de détecter la circulation de deux espèces de trypanosomes chez les rongeurs en Asie du Sud-est : *T. evansi* et *T. lewisi*. La plus grande difficulté a été d'essayer d'adapter aux rongeurs des protocoles standardisés pour d'autres espèces. Ceci a requis beaucoup de temps, qui n'a pas pu être dédié à l'analyse de la totalité des échantillons du projet CERoPath.

Les amorces TRYP1 se sont révélées ne pas être spécifiques pour les trypanosomes, en effet elles donnent des faux positifs qui ne correspondent pas à l'amplification du génome du parasite. La spécificité pourrait être améliorée en augmentant la température d' « annealing » pendant les cycles PCR. Mais des études supplémentaires sont nécessaires pour dessiner des amorces plus spécifiques, capables de détecter uniquement *T. lewisi*.

Sur le possible rôle de rongeurs comme réservoir de *T. evansi* pour les bovins, nous ne pouvons pas conclure à cause de la faible circulation du parasite dans le site choisi pour l'enquête mixte, Buriram. Un échantillonnage complémentaire dans un site avec une prévalence élevée de *T. evansi* est souhaitable pour pouvoir évaluer le rôle des rongeurs comme réservoir.

Pour la première fois sur le territoire Thaïlandais, des rongeurs ont été détectés comme positifs à *T. evansi* à l'aide de deux jeux d'amorces : premièrement avec TRYP1, et ensuite avec TBR. Nous avons une confirmation de la présence d'ADN du parasite dans le sang des rongeurs. En sachant qu'en Thaïlande il y eu un cas humain d'infection à *T. evansi*, il est intéressant de remarquer que les trois rongeurs positifs ont été piégés dans les bâtiments de l'Université de Kasetsart, dans un milieu avec une forte présence humaine. Des études futures sont nécessaires pour mieux évaluer le possible risque de contamination humaine par les rongeurs.

## Bibliographie

1. Artama W. T., Agey M. W., Donelson J. E. (1992). DNA comparisons of *Trypanosoma evansi* (Indonesia) and *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitology* **104**, 67-74.
2. Balber A. E. (1986). A surface glycoprotein of *Trypanosoma lewisi* binds immunoglobulin G from the serum of uninfected rats. *Infection and immunity*, **53**, 420-426.
3. Betancourt A.E., Ramirez L.E., Wells E.A., Bazalar H.(1979) La tecnica de centrifugacion en tubo capilar en el diagnostico de tripanosomiasis experimental. *Revta ICA, Bogota (Colombia)*, **14**, 97-104.
4. Borst (1987), P., Fase-Fowler, F. and Gibson, W.C.,. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Mol Biochem Parasitol* **23**: 31-8.
5. Brown W.H. (1914). A note on the pathogenicity of *Trypanosoma Lewisi*. *The Journal of experimental medicine*, **19**, 406-410.
6. Chippaux A., Deubel V. (1991). Application de l'amplification génomique en chaine (PCR) au diagnostic en virologie. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **84**, 704-711.
7. Davis B. S. (1952). Studies on the trypanosomes of some California mammals. *Univ. California Pub. Zool.* **57**(3), 145.
8. Davison H.C., Thrusfield M.V., Muharsini S., Husein A., Partoutomo S., Masake R. & Luckins A.G. (1999). Evaluation of antigen- and antibody-detection tests for *Trypanosoma evansi* infections in buffaloes in Indonesia. *Epidemiol. Infect.*, **123**, 149-155.
9. Desquesnes M, De La Rocque S.(1995). Comparaison de la sensibilité du test de Woo et d'un test de détection des antigènes de *Trypanosoma vivax* chez deux moutons expérimentalement infectés avec une souche guyanaise du parasite. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.* **48**, 247-253.
10. Desquesnes M. (2004). – Livestock Trypanosomoses and their vectors in Latin America. OIE
11. Desquesnes M., Bosseno M.F., Breniere S.F. (2007). Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Genet. Evol.* **7**, 457-462.
12. Desquesnes M., Davila A.M.R. (2002). Application of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet. Paras.* **109**, 213-231.
13. Desquesnes M., Kamyinkird K., Pruvot M., Kengradomkij C., Bossard G., Sarataphan N., Jittapalapong S. (2009). Antibody-ELISA for *Trypanosoma evansi*: application in a serological survey of dairy cattle, Thailand, and validation of locally produced antigen. *Prev. Vet. Med.* In press.
14. Desquesnes M., McLaughlin G.(2001). Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int. Jour. Of Paras.* **31**, 609-613.
15. Desquesnes M., Ravel S., Cuny G. (2002). PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats. *Kinetoplastid Biology And Disease* **1**:2.
16. Fernández D., González-Baradat B., Eleizalde M., González-Marcano E., Perrone T. and Mendoza M. (2008). *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Exp. Paras.* **121**, 1-7.

17. Herrera, H.M., Norek, A., Freitas, T.P., Rademaker, V., Fernandes, O., Jansen, A.M., 2005. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. *Parasitology Research* **96**, 121–126.
18. Hoare C.A. (1938). Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. V. The diagnostic value of the kinetoplast. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* **32**, 333.
19. Holland W. G., Claes F., My L. N., Thanh N. G, Tam P. T., Verloo D., Büscher P., Goddeeris B., Vercruysse J. (2001). A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes *Vet. Paras.* **97**, 23-33.
20. Howie S. (2006). A gambian infant with fever and an unexpected blood film. *Plos Medicine*, **3**, 1508-1512.
21. Jittapalapong S. et al. (2007). Molecular detection of divergent trypanosomes among rodents in Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, **8**, 445–449.
22. Lanham S., Godfrey D.G. (1970). Isolation of Salivarian Trypanosomes from Man and others mammals using DEAE-Cellulose. *Exp. Paras.* **28**, 521-534.
23. Lincicome D.R., Rossan R.N., Jones W.C. (1963). Growth of rats infected with *Trypanosoma lewisi*. *Exp. Paras.* **14** (1), 54.
24. Luckins A.G. (2004) OIE : Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees).
25. Lun Z. R. (2008). Atypical human trypanosomiasis: a neglected disease or just an unlucky accident? *Trends in Parasitology*, **25**, 107-108.
26. MacLeod A., Turner C.M.R., Tait A. (1997). Detection of single copy gene sequences from single trypanosomes. *Mol. and Bioch. Par.* **84**, 267-270.
27. Masiga D.K., Smyth A.J. et al. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. Jou. for Paras.* **22**, 909-918.
28. Onah, D.N., Hopkins, J. and Luckins, A.G., 2000. Effects of the depletion of CD8(+) T cells and monocytes on the proliferative responses of peripheral blood leucocytes from *Trypanosoma evansi*-infected sheep. *Vet Parasitol* **92**: 25-35.
29. Sarataphan N. (2007). Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (*Herpetosoma*) infection in a sick infant from Thailand. *Journal of Medical Microbiology*, **56**, 1118–1121.
30. Shrivastava K.K. (1974). Two cases of *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) species infection of man in India. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* **68**, 143-144.
31. Taliaferro W. H. (1926). Variability and inheritance of size in *Trypanosoma lewisi*. *J. exp. Zool.* **43**, 429.
32. Urakawa T., Verloo D., Moens L., Buscher P., Majiwa P. *Trypanosoma evansi*: cloning and expression in *Spodoptera fugiperda* insect cells of the diagnostic antigen RoTat 1.2. *Experimental Parasitology* **99**, 181-189.
33. Verloo D., Holland W., My L.N., Thanh N.G., Tam P.T., Goddeeris B., Vercruysse J., Buscher P. (2000). Comparison of serological tests for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from north Vietnam. *Veterinary Parasitology* **92**, 87-96.
34. Woo P.T.K., (1969). The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Canadian journal of zoology*, **47**, 921-923.
35. Wyatt K.B., Campos P.F., Gilbert M.T.P, Kolokotronis S., Hynes W.H., DeSalle R., Daszak P., MacPhee R.D.E., Greenwood A.D. (2008). Historical Mammal Extinction on Christmas Island (Indian Ocean) Correlates with Introduced Infectious Disease. *Mammal. Extinction and diseases* **3**, 11.

## **Extraction d'ADN à partir du sang congelé avec le kit « Genaid ® »**

Ajouter l'éthanol absolu au Wash Buffer avant la première utilisation.

### **1. Lyse cellulaire**

- Déposer 200 µl de sang dans un microtube à centrifugation de 1,5 ml. Si le volume de l'échantillon n'est pas suffisant, ajouter un volume approprié de PBS.
- Ajouter 30 µl de Protéinase K (10 mg/ml) dans le microtube et mélanger avec le vortex. Incuber dans un bain marin à 60°C pendant 15 minutes.
- Ajouter 200 µl de GB Buffer et mélanger avec le vortex.
- Incuber à 70°C dans le bain marin pendant 15 minutes. Invertir les tubes tout les 3 minutes pendant l'incubation.
- Préchauffer 200 µl de Elution Buffer par échantillon dans le bain marin.

### **2. Liaison de l'ADN**

- Ajouter 200 µl d'éthanol absolu au lysat de l'échantillon et mélanger avec le vortex immédiatement. Si il y a l'apparition d'un précipitât, utiliser une pipette pour le dissoudre.
- Mettre une colonne GD dans un tube collecteur de 2 ml.
- Transférer la mixture, avec l'éventuel précipitât, dans la colonne GD.
- Centrifuger à 10000rpm pendant 5 minutes.
- Jeter le tube collecteur contenant le filtrat, et mettre la colonne dans un nouveau.

### **3. Lavage**

- Ajouter 400 µl de W1 Buffer dans la colonne et centrifuger à 10000 rpm pendant 30 seconds.
- Jeter le filtrat et repositionner la colonne dans le tube collecteur.
- Ajouter 600 µl de Wash Buffer (dans le quel l'éthanol a été ajouté) dans la colonne et centrifuger à 10000 rpm pendant 30 seconds.
- Jeter le filtrat et repositionner la colonne dans le tube collecteur ; centrifuger à 10000 rpm pendant 3 minutes pour sécher la matrice de la colonne.

### **4. Éluion de l'ADN**

Le volume standard d'éluion est de 100 µl. Si un volume inférieure d'échantillon sera utilisé, il est possible réduire ce volume à 30-50 µl.

- Transférer la colonne GD dans un nouveau microtube à centrifugation de 1,5 ml.
- Ajouter 100 µl de Elution Buffer préchauffé dans le centre de la matrice de la colonne.
- Laisser adsorber le buffer par la matrice pendant 3-5 minutes.
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 30 secondes pour permettre l'éluion de l'ADN purifié.

## **Extraction du DNA au Phénol-chloroforme et précipitation à l'Ethanol pour la réalisation de PCR**

1. L'ADN est extrait à partir d'un échantillon de sang de 100µl mélangé avec 500µl d'une solution de dénaturation. Mélanger pendant 5-10 min avec le vortex.
2. Ajouter 150µl de chloroforme et en suite 150µl de phénol (pH 7,9). Mélanger pendant 10 min.
3. Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 min pour séparer les deux phases.
4. Collecter le surnageant (550-600 µl) et le mettre dans un nouveau microtube (1,5ml), en évitant les protéines à l'interface du phénol aqueux.
5. Répéter le protocole pour nettoyer le surnageant (points 2-4). Dans un deuxième temps, collecter 400µl de surnageant et le transférer dans un nouveau micro tube (1,5ml).
6. Faire précipiter l'ADN en ajoutant 1 ml de éthanol absolu (99,9%) et invertir doucement le tube. Le conserver à -80°C pendant 30 min ou à -20°C pendant une nuit.
7. Centrifuger à 13000 rpm pendant 10 min. Etirer le surnageant.
8. Laver les pellet d'ADN avec 700 µl d'éthanol 75% : centrifuger à 13000 rpm pendant 5 min.  
Prélever le surnageant et répéter le lavage et la centrifugation. Laisser sécher le pellet à l'air.
9. Dissoudre les pellet avec 40-50µl de TE buffer et stocker à -20°C.